

## 明 細 書

## 遺伝子多型の検出方法

## 技 術 分 野

5 本発明は、ENAユニットを含むオリゴヌクレオチドを用いたPCRを利用した、遺伝子多型の検出方法、遺伝子多型の検出用のオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型検出用キットに関する。

## 背 景 技 術

10 ファーマコジェノミクス研究の進展により、遺伝子多型と薬効、あるいは遺伝子多型と副作用の関係から、個々の患者に対する薬物の効果や副作用を、遺伝子診断で予測することが可能になりつつある。このような例としては、薬物代謝酵素の遺伝子多型の例が挙げられる。多型により活性が増加、あるいは、減少する薬物代謝酵素としては、シトクロムP 450 1A2、シトクロムP 450 2A6、シトクロムP 450 2C9、シトクロムP 450 2C19、シトクロムP 450 2D6、シトクロムP 450 2E1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクuronsilトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど抱合酵素と呼ばれる一群の酵素群にも遺伝子多型が存在し、多型により活性が減少することが報告されている（中村祐輔編、「SNP 遺伝子多型の戦略」、中山書店、2000年6月5日）。

また、遺伝子多型と疾患との関係を調べることにより、一部の疾患の事前診断や予後の判定も可能になりつつあり、多型解析研究から見出された疾患原因遺伝子が多数報告されている。例えば、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのHLA、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのTCR  $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのAPOE 4、精神分裂症の原因遺伝子としてのドーパミンD 3受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプトファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子VII、肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどが報告されている（Nature Genetics、1999年、第22巻、p.139-144）。

遺伝子多型の検出方法として、ポリメラーゼチェインリアクション（PCR）法と制限酵素による切断とを組み合わせたPCR-RFLP法（Science、1991年、第252巻、

p. 1643-)、配列の異なる一本鎖のDNAもしくはRNAはポリアクリルアミドゲル中で異なる移動度を示すという原理に基づいたSSCP (single-strand conformation polymorphism) 法、または、オリゴスクレオチドプライマーの3'末端付近にミスマッチがあるとプライマーの伸長反応が阻止されるという原理に基づいたAS-PCR (allele-specific PCR) 法などが開発されている。

PCR-RFLP法は、検査工程に3～24時間の制限酵素処理を含むために、迅速な方法とは言い難い。SSCP法は検査対象となる塩基配列のどこかに、一個もしくは複数の変異が存在する場合に、その存在を高感度に検出できる点で優れている。しかし、微妙な移動度の差を検出するために実験条件を厳密にコントロールしなければならないので、非常に手間がかかる方法であり、かつ変異の位置を同定できない。また、実際の検体、たとえば血液や組織からSSCP法を行うには、クローニングやPCR法を用いて、事前に大量の核酸を調製する必要があり、多数の検体を効率よく検査するには適さない方法である。

AS-PCR法はPCRを応用した方法であり、事前に大量の核酸を調製する必要はない、3'末端付近にミスマッチのないプライマーを使用したときのみ増幅産物が得られることを応用したもので、多数の検体を効率よく検査するために適した方法である。しかし、通常のPCRではプライマーにミスマッチが存在する場合でも増幅産物が得られる場合があり、厳密性に問題があった。

また、AS-PCR法を改変し、3'末端から2番目に対象遺伝子とは相補的ではない塩基を持つスクレオシドを持ち、3'末端に検出したい多型部分を設定した場合、3'末端から2番目に対象遺伝子と相補的である塩基を持つスクレオシドをもつプライマーに比べ、3'末端に存在する多型部位の検出が改善される報告がある (Bioorganic & Medical Chemistry, 2003年、第11巻、p. 2211-2226)。しかし、この方法を用いた場合でもプライマーの3'末端にミスマッチが存在しても増幅産物が得られることがあり、より検出感度の高い遺伝子多型の検出方法の開発が求められていた。

2'-O,4'-C-エチレンスクレオチド（以下、「ENAスクレオチド」ともいう。）は非天然型のスクレオチドである。ENAスクレオチドを導入したオリゴスクレオチドは、相補鎖RNAに対して高い結合能を有している（日本国特許第3420984号公報（日本国公開特許公報 特開平12-297097）及びBioorganic & Medical Chemistry, 2003年、第11巻、p. 2211-2226。）。また、ENAスクレオチドは糖部の2'位酸素原子と4'位炭素原子を

メチレン鎖で架橋したスクレオチドである LNA スクレオチド (2'-0,4'-C-メチレンスクレオチド (日本国公開特許公報 特開平 10-304889 号) よりもスクレアーゼに対して高い抵抗性を有するという特徴を持っている (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002 年、第 12 卷、p. 73-76)。しかしながら、ENA スクレオチドをプライマーとして用いることによって AS-PCR の測定精度を向上させることができると否かは不明であった。

本発明者らは、上記 多型の検出方法の問題点を解決すべく、検討を行ったところ、多型部位を 3' 末端にし、さらに 3' 末端から 3 番目に ENA 修飾が加えられたオリゴスクレオチドを PCR プライマーとして用いた場合、ミスマッチによる増幅産物の生成量が減少し、精度が高く遺伝子多型が検出できることを見出し、更に該検出方法に用いることができるキットを提供した。

更に本発明者らは、多型部位を 3' 末端にし、3' 末端から 2 番目のスクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つスクレオチドにし、3' 末端から 3 番目に ENA 修飾が加えられたオリゴスクレオチドを PCR プライマーとして用いた場合、ミスマッチによる増幅産物の生成量が減少し、精度が高く遺伝子多型が検出できることを見出し、更に該検出方法に用いることができるキットを提供し、本発明を完成させた。

## 発明の開示

本発明の課題は、遺伝子多型を検出する方法及び該方法に使用することができるオリゴスクレオチドを提供し、さらに、該オリゴスクレオチドを含む遺伝子多型検出用キットを提供することである。

本発明は鋳型となる核酸のスクレオチド配列と相補的なスクレオチド配列からなる合成オリゴスクレオチドプライマーを合成する際に、合成オリゴスクレオチドプライマーの 3' 末端のスクレオチドを鋳型のスクレオチドと相補的ではないスクレオチドにすると DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起こらず、鋳型となる核酸のスクレオチド配列と完全に相補的な合成オリゴスクレオチドプライマーを用いた場合には DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起きる現象を利用した遺伝子多型の検出方法に関する。

さらに詳しくは、本発明は、合成オリゴスクレオチドのスクレオチド配列の 3' 末端を多型部位にし、さらに 3' 末端から 3 番目のスクレオチドとして 2'-0,4'-C-エチレンヌ

クレオチド (ENA) ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることを特徴とする遺伝子多型の検出方法に関する。

さらに本発明は、合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の3'末端を多型部位にし、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3'末端から3番目のヌクレオチドとして2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることを特徴とする遺伝子多型の検出方法に関する。

本発明の課題を解決手段としては具体的には、

(1) 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) 3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

(2) 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) 3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

(3) 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目（3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目）のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(d) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目（3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目）のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(4) 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

5 (b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

10 (d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

(5) 18 乃至 25 塩基長からなることを特徴とする、(1) 乃至 (4) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩。

(6) (1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法。

15 (7) (1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法。

(8) 以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型の検出方法：

20 (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程；

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程。

(9) 以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法：

25 (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程；

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程。

30 (10) 反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、TaqMan PCR 及び MALDI

—TOF/MS法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする(8)又は(9)に記載の方法、

(11) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(6)乃至(10)のいずれか1項に記載の方法、

5 (12) 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液、

15 (13) 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液、

25 (14) 以下の(a)乃至(e)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

- 5 (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；  
(d) DNAポリメラーゼ；  
(e) PCR緩衝液；

10 (15) 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット：

- (a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：  
15 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；  
(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；  
(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；  
(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；  
20 (b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；  
(c) DNAポリメラーゼ；  
25 (d) PCR緩衝液；

(16) 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット：

- (a) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；  
30 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；  
(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目

として2番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

5 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

10 (c) DNAポリメラーゼ;

(d) PCR緩衝液;

(17) 以下の(a)乃至(e)を含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) 以下の(i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

15 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

20 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

25 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

30 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有す

る；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目（3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目）のヌクレオチドが 2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

5 (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液、

(18) オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が 18 乃至 25 塩基長であることを特徴とする、

10 (12) 乃至 (17) のいずれか 1 項に記載の遺伝子多型検出用キット、

(19) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(12) 乃至 (18) のいずれか 1 項に記載のキット、

からなる。

15 本発明における、遺伝子多型の検出方法の 1 つの原理は以下の通りである。

(1) 遺伝子多型を検出したい配列(目的配列)の多型部分にプライマーの 3' 末端を設定し、かつプライマーの 3' 末端から 3 番目に 2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットの修飾を加える。このプライマーと遺伝子多型検出対象のヌクレオチド配列を含む核酸を反応液中で核酸合成酵素の混合物と作用させると、プライマーの 3' 末端が一致する（塩基が相補的である）場合は、核酸合成反応が起こる。これに対して、3' 末端が一致しない場合は、核酸合成反応が起こらない。このように 3' 末端が一致する場合は核酸合成反応が起こり、一致しない場合は核酸合成反応が起こらない違いを利用して、ヌクレオチド配列の変異を検出することができる。この原理を図 1 と図 2 で説明する。

図 1 は、核酸配列に変異(多型)がない場合を示す。(i) は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鑄型核酸で、塩基配列の一部に 3'-ATGC-5' の配列をもつ。この鑄型核酸と 3' 末端から 3 番目に ENA 修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(ii) (2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットを eT と表記する) とがアニーリングして 2 本鎖を形成する。この場合、(ii) の塩基配列の内少なくとも 3' 末端は対応するの塩基と相補な構成になっており、(ii) と(i) とは 2 本鎖を形成する。この 2 本鎖を形成しているオリゴヌクレオチド(ii) の 3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii) が認識し、核酸合成反応が進行する。

ここに示した具体的な塩基配列は説明のためのものであり、この塩基配列のみに有効であることを意味するものではない。

図2は核酸配列に変異(多型)がある場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鑄型核酸で、塩基配列の一部に3'-ATAC-5'の配列をもつ。この鑄型核酸と  
5 3'末端から3番目にENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(ii)(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジンユニットをeTと表記する)とがアニーリングして2本鎖を形成する。この場合、(ii)の塩基配列の内少なくとも3'末端は対応する塩基と相補的な構成になっておらず、(ii)の3'末端のCが(i)内のAとワトソン-クリック塩基対を形成していない。このワトソン-クリック塩基対を形成していないオリゴヌクレオチド(ii)の3'末端の部分を核酸合成酵素(iii)が認識できず、核酸合成反応が続行することができない。ここに示した具体的な塩基配列は説明のためのものであり、この塩基配列のみに有効であることを意味するものではない。

本発明における、遺伝子多型の検出方法の他の1つの原理は以下の通りである。

(2) 遺伝子多型を検出したい配列(目的配列)の多型部分にプライマーの3'末端を  
15 設定し、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、かつプライマーの3'末端から3番目にENAユニットの修飾を加える。このプライマーと遺伝子多型検出対象のヌクレオチド配列を含む核酸及び該プライマーと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを反応液中で核酸合成酵素の混合物と作用させると、プライマーの3'末端が一致する(塩基が相補的である)場合は、核酸合成反応が起こり、遺伝子が増幅される。これに対して、3'末端が一致しない場合は、核酸合成反応が起こらず、遺伝子の増幅は見られない。このように3'末端の塩基が相補する場合は核酸合成反応が起こり、相補しない場合は核酸合成反応が起こらない違いを利用して、ヌクレオチド配列の変異を検出することができる。この原理を  
20 図3と図4で説明する。

25 図3は、核酸配列に変異(多型)がない場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鑄型核酸で、塩基配列の一部に3'-ATGC-5'の配列をもつ。(ii)はプライマーである。このプライマーでは、3'末端から2番目のヌクレオシドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオシドにし(図ではグアニン(G))、それ以外のヌクレオシドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオシドである。また、3'末端から3番目はENA  
30 修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジンユニッ

トを eT と表記する) にしている。この場合、(ii) のヌクレオチド配列のうち 3' 末端から 2 番目以外のヌクレオチド配列は対応する(i) のヌクレオチド配列と相補的な配列になっており、(ii) のヌクレオチド配列のうち 3' 末端から 2 番目でミスマッチするものの、鑄型核酸と多型検出用プライマーがアニーリングして 2 本鎖を形成する。この相補鎖を形成しているオリゴヌクレオチド(ii) の 3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii) が認識し、核酸合成反応が続行する。

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

図 4 はヌクレオチド配列に変異(多型)がある場合を示す。(i) はヌクレオチド配列の変異(多型)を調べようとする対象の鑄型核酸で、ヌクレオチド配列の一部に 3'-ATAC-5' の配列をもつ。(ii) はプライマーである。このプライマーでは、3' 末端及び 3' 末端から 2 番目のヌクレオシドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオシドにし(図ではグアニン(G))、それ以外のヌクレオシドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオシドである。また、3' 末端から 3 番目は ENA 修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットを eT と表記する) にしている。この場合、(ii) のヌクレオオチド配列のうち、3' 末端及び 3' 末端から 2 番目のヌクレオシドは対応するヌクレオシドと相補的なヌクレオシドになっておらず、(ii) の 3' 末端部分がワツソーンクリック塩基対を形成しない。このワツソーンクリック塩基対を形成していないオリゴヌクレオチド(ii) の 3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii) が認識できず、核酸合成反応は進まない。

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

本発明により、新規な遺伝子多型の検出方法が提供された。本発明の遺伝子多型の検出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになった。

また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットも提供された。

## 1. 用語の説明

30 本明細書中において「遺伝子多型」とは、ある遺伝子座において、(a) 1 個の塩基が他

の塩基に置き換わっているもの（一塩基多型（SNP））及び／又は（b）1から数十塩基（数千塩基のこともある）が欠失や挿入をしているもの（挿入／欠失多型）を意味する。本明細書において、一塩基多型とはSNP(single nucleotide polymorphism)ともいい、個人間におけるヌクレオチド配列中の一塩基の違いをいう。

5 一塩基多型部分のヌクレオチドとしては2種類のヌクレオチドの変異が存在することが知られており（例えば、アデニンかグアニン、チミンかシトシン等）、その変異の割合は対象となる遺伝子によって異なっている。本明細書中において、「対象遺伝子」とは、遺伝子多型を検出する対象とする遺伝子のことをいう。

本明細書においては、対象遺伝子の一塩基多型部位の2種類の塩基の変異のうちで出現頻度の高いヌクレオチドを含む配列を基準配列とし、基準配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを基準ヌクレオチドとし、出現頻度の低いヌクレオチドを含む配列を変異配列とし、変異配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを変異ヌクレオチドとする。

また、多型が欠失多型の場合には欠失がない配列を基準配列とし、欠失がある配列を変異配列とする。

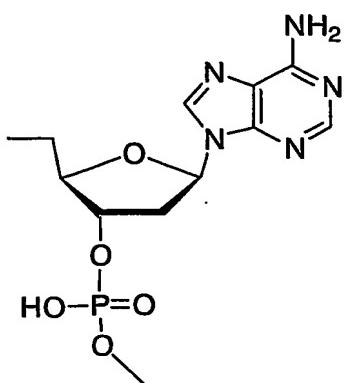
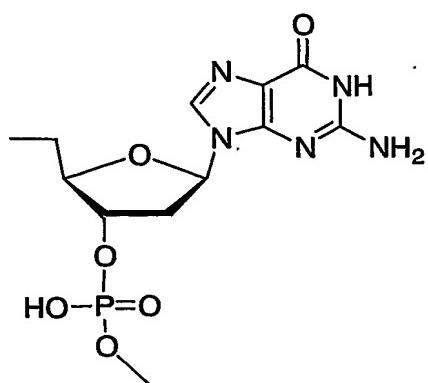
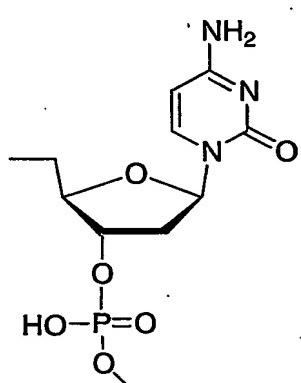
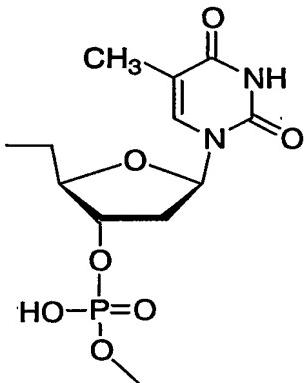
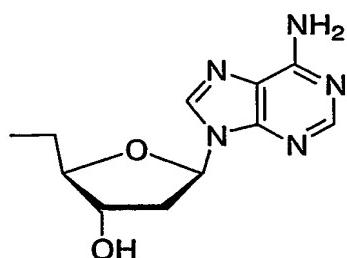
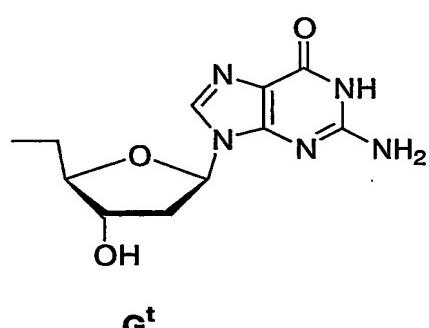
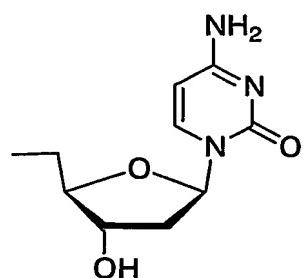
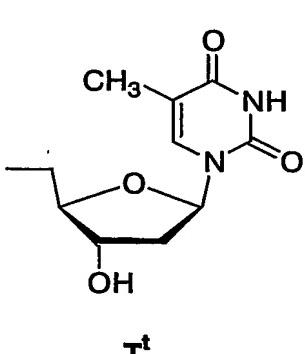
15 さらに、多型が挿入多型の場合には挿入がない配列を基準配列とし、挿入がある配列を変異配列とする。

また、本明細書中において、「多型を有する」とは、対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が変異配列を有することを意味し、「多型を有さない」とは対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が基準配列であることを意味する。

20 本明細書中において、「天然型のヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチドをいう。また、「天然型のオリゴヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチド等の天然型ヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドのことを示す。

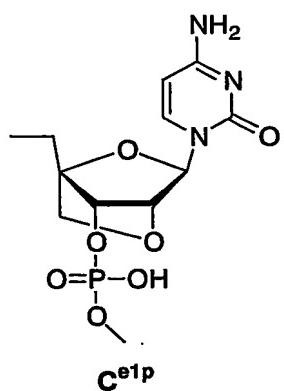
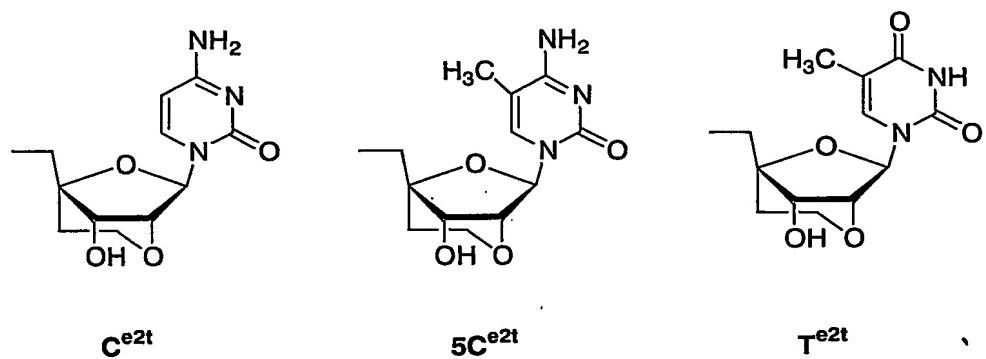
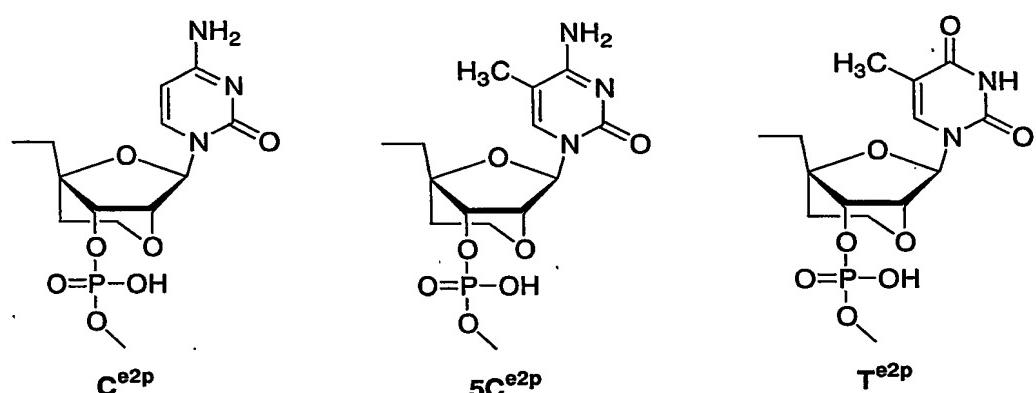
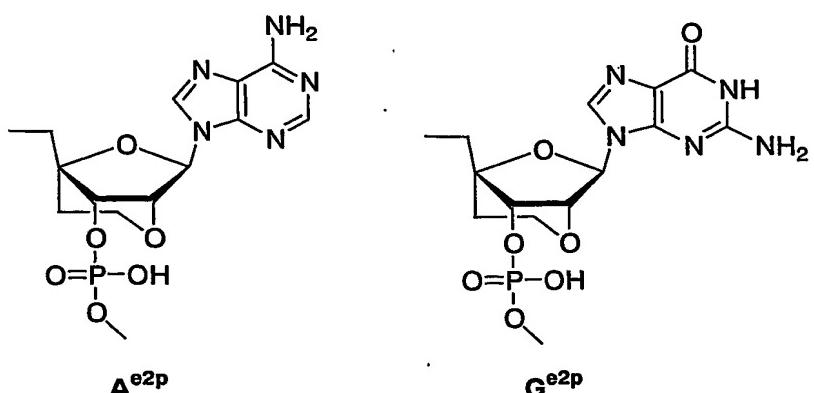
25 本明細書においてはアデニンヌクレオチドをA<sup>P</sup>、グアニンヌクレオチドをG<sup>P</sup>、シトシンヌクレオチドをC<sup>P</sup>及びチミンヌクレオチドをT<sup>P</sup>と表記することもある。また天然型のオリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオシド、アデニンヌクレオシドはA<sup>t</sup>、グアニンヌクレオシドはG<sup>t</sup>、シトシンヌクレオシドはC<sup>t</sup>及びチミンヌクレオシドはT<sup>t</sup>と表わすことができる。

30 天然型のヌクレオチドの構造式を以下に示す。

 $\text{A}^{\text{P}}$  $\text{G}^{\text{P}}$  $\text{C}^{\text{P}}$  $\text{T}^{\text{P}}$  $\text{A}^{\text{t}}$  $\text{G}^{\text{t}}$  $\text{C}^{\text{t}}$  $\text{T}^{\text{t}}$

本明細書中において、「ENA ヌクレオチド」(以下、「ENA」ともいう。)とは、糖部の2'位酸素原子と4'位炭素原子をエチレン鎖で架橋したヌクレオチドである(特許第3420984号参照。)。

- 5 本明細書において2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチドユニット及び「ENAユニット」とはA<sup>e2p</sup>、G<sup>e2p</sup>、C<sup>e2p</sup>、5C<sup>e2p</sup>、T<sup>e2p</sup>、または、オリゴヌクレオチドの3'末端に有する場合、ENAをヌクレオシドとして扱う場合は、C<sup>e2t</sup>、5C<sup>e2t</sup>、T<sup>e2t</sup>、から選択されるいずれかの基を意味し、その構造は下記に示すとおりである。またLNAユニットとしてC<sup>e1p</sup>の構造も示す。



本明細書中における、「相補的なヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの塩基部分が相補するヌクレオチドのことをいい、具体的には、塩基部分がアデニンとチミン、グアニンとシトシン及びアデニンとウラシルであるヌクレオチドが互いに相補的なヌクレオチドである。

5 本明細書中における、「その塩」とは、本発明の化合物は、塩にすることができるので、その塩をいい、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシリジン塩、N, N' -ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジルフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマール酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔥酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

なお、本発明の化合物及びその塩は、水和物としても存在することができ、本発明は、それらの水和物をも包含する。

## 25 2. 検体

本発明で遺伝子多型を検出する対象となる検体としては、核酸を含む試料を用いることができる。核酸としては一例として、ゲノムDNAを挙げることができるが、これに限定されない。

例えば、ヒトの遺伝子の多型を検出するためにはヒトゲノムDNAを含む検体を用いることができ、マウスの遺伝子の多型を検出するためには、マウスゲノムDNAを用いること

ができる。ゲノムDNAは当業者に公知の方法で取得することができる。以下、ヒトのゲノムDNAを例にして説明するが、他の生物由来のゲノムDNAも同様に取得することができる。

ゲノムDNAを得るための材料としては、被験者から採取されたあらゆる細胞（生殖細胞を除く）、組織、臓器等を使用することができるが、好ましくは末梢血から分離した白血球または単核球であり、最も好適には白血球である。これらの材料は、臨床検査において通常用いられる方法によって採取され得る。

例えば白血球を用いる場合、まず被験者より採取した末梢血から周知の方法で白血球を分離する。次いで、得られた白血球にプロテイナーゼKとドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を加えてタンパク質を分解、変性させた後、フェノール／クロロホルム抽出を行うことによりゲノムDNA（RNAを含む）を得る。RNAは、必要に応じRNaseにより除去することができる。ただし、本発明はこれに限定されず、ヒトゲノムDNAを含む試料からのゲノムDNAの抽出にあたっては、本発明の技術分野において周知の方法、すなわち文献（例えば、Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)" Cold Spring Harbor Laboratory, NY 参照）に記載されている方法や、市販のDNA抽出キット等を利用する方法も好ましく用いることができる。

DNAを含む検体は、PCRに用いることができる限度においてその純度は問わず、試料よりの粗抽出物、精製物等を用いることができる。

### 3. 対象遺伝子の選択

遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子は、少なくとも一部のヌクレオチド配列が既に知られており、その部分に多型が存在するものであればいずれでもよい。そのような遺伝子の一例として、薬効や薬の副作用に関与する薬物代謝遺伝子である、シトクロムP450 1A2、シトクロムP450 2A6、シトクロムP450 2C9、シトクロムP450 2C19、シトクロムP450 2D6、シトクロムP450 2E1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクuronsilトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼや、疾患との関連遺伝子として、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのHLA、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのTCR $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのAPOE 4、精神分裂症の原因遺伝子としてのドーパミンD 3受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプ

トファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子VII及び肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどを挙げることができる。その他 human prothrombin 等を挙げることもできる。

また、マウスのゲノムDNAを検体として用いる場合にはマウスのアンジオポエチン関連3 (Angiopoietin-like 3) 遺伝子のプロモーター上の多型及び、欠失多型も挙げることができる。

なお、遺伝子中の多型の位置は翻訳領域、非翻訳領域、プロモーター、イントロン等の調節領域及びその他の領域のいずれであってもよい。

#### 10 4. オリゴヌクレオチドプライマー

以下のオリゴヌクレオチドは、核酸自動合成機を用いて合成することができる。

天然のオリゴヌクレオチドについては天然のホスホロアミダイトを使用して合成することができる。2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチドについては特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト)、実施例 27 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト)、実施例 5 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト)、実施例 22 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト)、実施例 9 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) に記載の化合物を用いることによって合成することができる。

##### (1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド

25 (1) - 1 本発明で用いる遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (a) 及び (b) を挙げることができる。

##### (a) 基準配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

以下の(i)乃至(iii)の特徴を有する；

(i) オリゴヌクレオチドの3' 末端から3番目(3' 末端のヌクレオチドを1番目として3番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、

他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(ii) 3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

(iii) オリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15~40 ヌクレオチド、より好ましくは 5 18~35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18~25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「X-PRIMER」と呼ぶことにする。

10 (b) 変異配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

15 (ii) 3' 末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

(iii) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15~40 ヌクレオチド、より好ましくは 18~35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18~25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

20 上記 (a) 及び (b) 中の(i)において、オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットであるとは、3 番目のヌクレオチドを天然型のヌクレオチドではなく、ENA ヌクレオチドであることをすることを意味する。例えば、A<sup>p</sup> の代わりに A<sup>e2p</sup>、G<sup>p</sup> の代わりに G<sup>e2p</sup>、C<sup>p</sup> の代わりに 5 C<sup>e2p</sup> または C<sup>e2p</sup>、T<sup>p</sup> の代わりに T<sup>e2p</sup> を用いることを意味する。

25 このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「Y-PRIMER」と呼ぶことにする。

(1) - 2 本発明で用いる遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとしては、更に以下の (c) 及び (d) を挙げることができる。

30 (c) 3' 末端部位から 2 番目のヌクレオチド以外が基準配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する；

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、

10 他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「N-PRIMER」と呼ぶこと  
15 にする。

(d) 3'末端部位から2番目のヌクレオチド以外が変異配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する；

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

25 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「P-PRIMER」と呼ぶことにする。

上記 (a) 乃至 (d) 中の(iv)において、オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットであるとは、3番目のヌクレオチドが天然型のヌクレオチドではなく、ENAヌクレオチドであることを意味する。例えば、A<sup>p</sup>の代わりにA<sup>e2p</sup>、G<sup>p</sup>の代わりにG<sup>e2p</sup>、C<sup>p</sup>の代わりに5C<sup>e2p</sup>またはC<sup>e2p</sup>、T<sup>p</sup>の代わりにT<sup>e2p</sup>が用いられることを意味する。

なお、これらの(a)乃至(d)のオリゴヌクレオチドをPCR用フォワード・プライマー(Forward primer)と呼ぶこともある。

10 (2) 対になって用いられるオリゴヌクレオチド

(a) PCR用オリゴヌクレオチド

PCRにおいて上記(1)に記載の(a)乃至(d)のいずれかのオリゴヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記(1)の(a)乃至(d)のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を增幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する相補鎖の配列中の連續した15～40ヌクレオチド、好ましくは18乃至35ヌクレオチド、更に好ましくは18乃至25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドに互いに相補的な配列が存在すると、お互いにアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子多型の検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたオリゴヌクレオチド及び対になるオリゴヌクレオチドの設計を行うことが好ましい。

なお、本明細書においては、対になるオリゴヌクレオチドをリバース・プライマー(Reverse primer)と呼ぶこともある。

(b) TaqManプロープ

TaqMan PCRで用いる遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド(TaqManプロープ)は5'末端はFAMやVICなどの蛍光レポーター色素によって標識されており、同時に3'末端はクエンチャーで標識されており〔ジェネティク・アナリシス(Genet. Anal.), 14, p143-149 (1999), ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー(J.

Clin. Microbiol.), 34, p2933-2936 (1996)】。

上記(1)に記載の(a)乃至(d)のいずれかのオリゴヌクレオチドと対になって用いられるTaqManプローブの配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記(1)に記載の(a)乃至(d)のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を増幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する配列中の連続した15~40ヌクレオチド、好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとTaqManプローブに互いに相補的な配列が存在すると、お互いにアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子多型の検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたオリゴヌクレオチド及びTaqManプローブの設計を行うことが好ましい。

15 5. 遺伝子多型の検出方法

A. PCRによる遺伝子多型の検出

(1) PCR

上記「4. オリゴヌクレオチドプライマー」の項の「(1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」の項目で設計した(a)乃至(d)のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとを用いたPCR反応を行うことにより、対象遺伝子の所定の位置の多型を検出することができる。ここでPCRは(i) 「X-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(ii) 「Y-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(iii) 「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(iv) 「P-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(v) (i)と(ii)の組み合わせ、(vi) (iii)と(iv)の組み合わせのいずれかの組み合わせで行うことができる。

PCRの反応条件は所望の核酸配列を増幅できる限りにおいて特に制限されず、当業者が通常行う条件でPCRを行うことができるが、例えば以下のようにして行うことができ

る。

(a) 核酸合成酵素

核酸合成酵素としては、鋳型の核酸の種類に応じて、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素(reverse transcriptase)から適宜選択して用いることができる。ここで、DNA ポリメラーゼとしては、例えば、*Thermus aquaticus* 由来の Taq DNA ポリメラーゼ、*Thermus thermophilus* 由来の Tth DNA ポリメラーゼ、*Pyrococcus* 由来の KOD、Pfu あるいは PwoDNA ポリメラーゼ、あるいは前記の耐熱性ポリメラーゼの混合等があるが、これらにのみ限定されるものではない。なお Tth DNA ポリメラーゼは RT 活性も有しているため、RT-PCR を One tube-One step で行うときに、1 種類の酵素で済うことが出来る特徴を有している。逆転写酵素は、RNA を cDNA に逆転写出来る酵素を意味する。逆転写酵素としては、Rous associated virus (RAV) や Avian myeloblastosis virus (AMV) 等のトリのレトロウイルス由来の逆転写酵素、Moloney murine leukemia virus (MMLV) 等のマウスのレトロウイルス由来の逆転写酵素あるいは前記の Tth DNA ポリメラーゼ等があるが、これらにのみ限定されるものではない。

15. (b) PCR 反応

PCR 反応は例えば、以下のとおりである。

反応液組成の例：

塩化マグネシウム 2 乃至 2.5 mM (好ましくは 2.5 mM)；

1 × PCR 緩衝液 (10 mM トリス一塩酸 (25°C における pH 8.3) 乃至 9.0 (好ましくは 8.3))、50 mM 塩化カリウム；

dNTPs 0.2 乃至 0.25 mM (好ましくは 0.25 mM)；

遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチド 0.2 乃至 0.5 μM (好ましくは 0.2 μM)；

Taq ポリメラーゼ 1 乃至 2.5 単位 (好ましくは 2.5 単位)；

滅菌水を加えて全量を 80 μl に調整し、その全量を、逆転写反応を終了した反応液全量に加えてから PCR を開始する。

反応温度条件： まず 94°C で 2 分間加熱した後、90 乃至 95°C (好ましくは 94°C) で 30 秒間、40 乃至 65°C (好ましくは、プライマーの特性から算出される解離温度 (Tm) からそれより 20 度低い温度までの範囲内で 30 秒間、70 乃至 75°C (好ましくは 72°C) で 1.5 分間の温度サイクルを 28 乃至 50 サイクル (好ましくは 30 サイクル)

繰り返してから、4°Cに冷却する。

(2) 遺伝子多型の検出

PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的配列の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。

5 (a) 「X-PRIMER」を用いた場合

X-PRIMER及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、多型ではないと判定することができる。

10 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

(b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

Y-PRIMERと該該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

(c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型ではないと判定することができる。

一方、X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有すると判定する

ことができる。

(d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、多型ではないと判定することができる。

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

10 (e) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

15 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

(f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型ではないと判定することができる。

一方、「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」と該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有すると判定することができる。

上記(a)乃至(f)のいずれかと同様の実験をENAオリゴヌクレオチドを含まないオリゴヌクレオチドで行うと本来バンドが出ないはずの錆型となる核酸に対してもミスマ

ッチによるバンドの出現が確認され、本方法は従来の方法に比べ感度よく遺伝子多型を検出できることが確認できる。また、ENAユニットの代わりにLNAを用いた場合もミスマッチが確認されるが遺伝子多型の検出の精度は低下する。

また、ENAユニットの位置をオリゴヌクレオチドの3'末端から3番目以外にしたオリゴヌクレオチドを用いた場合には、遺伝子多型の検出の精度及び感度が低下する。

#### B. TaqMan PCRによる遺伝子多型の検出

上記、「A.」の項目において遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと上記「4.」の項目に記載のTaqManプローブを用い、ABI社 ABI PRISM等を用い、その添付プロトコールに従ってTaqMan PCRを行うことによって遺伝子多型を検出することができる。

##### 10 (a) 「X-PRIMER」を用いた場合

「X-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるTaqMan PCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型はないと判定することができる。

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

##### (b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

##### (c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

X-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

一方、X-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には遺伝子多型を有さないと判定することができる。

5 (d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるTaqMan PCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型はないと判定することができる。

10 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

(e) 「P-PRIMER」を用いた場合

15 「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

20 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

(f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

25 「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

一方、「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有さないと判定することができる。

30 C. MALDI-TOF/MS法による遺伝子多型の検出

MALDI-TOF/MS法による多型の検出法（「SNP遺伝子多型の戦略」（中村祐輔編），中山書店，東京，（2000）、p. 106-117）に記載の方法を一部改変することによって遺伝子多型を検出することができる。以下、具体的に説明する。

多型部位を含むPCR産物をゲノムDNAより増幅する。その際、多型部位の塩基とPCRプライマーは重複しないように設計する。  
5

次にPCR反応系に残存しているdNTPとプライマーとして用いたオリゴヌクレオチドを除去し、精製PCR産物とする。

精製PCR産物を鋳型として、上記「4.」の「(1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」に記載のオリゴヌクレオチドを鋳型に対して10倍以上の過剰量加え、90乃至95℃  
10でアニールさせ、サーマルサイクル反応を行う。サーマルサイクル反応はオリゴヌクレオチドの伸張反応が確認される限りにおいて特に制限されないが、例えば、94℃と37℃の2温度間で25回の反応で、適当な伸張効率が得られる。

得られた伸張反応産物を精製し、塩、緩衝液、界面活性剤、蛋白を除去する。この精製物をMALDIプレートにスポットし、MALDI-TOF/MSによって質量を分析する。

15 対象遺伝子の多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドであるときには遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドにddNTPが付加された伸張反応産物の蓄積が確認されるが、多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的でないときは伸張反応産物は蓄積されない。

「X-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は基準ヌクレオチドであり、多型を有さないと判定することができ、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は変異ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有すると判断できる。  
20

「Y-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は変異ヌクレオチドであり、多型を有すると判断でき、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は基準ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有さないと判断できる。

25 「N-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は基準ヌクレオチドであり、多型を有さないと判定することができ、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は変異ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有すると判断できる。

「P-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は変異ヌクレオチドであり、多型を有すると判断でき、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は  
30 基準ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有さないと判断できる。

また、キアゲン社 (Qiagen) の LightCycler system とそれを用いて PCR 産物を検出するキット (Quantitect SYBR Green PCR Kit) 等に応用することによって生成する PCR 産物の有無を検出することなどを用いて、PCR 産物を測定することも可能である。

5 6. 遺伝子多型の存在状態の確認

本発明の方法によると鋳型となる核酸中の多型がヘテロで存在するかホモで存在するかを判定することができる。具体的には以下の (a) 乃至 (f) のいずれかの方法によって判定することができる。

(a) 「X-PRIMER」を用いた場合

10 「X-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合にホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

(b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

15 Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合にホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

(c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

20 X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERと該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによっても目的とする配列の増幅が確認できる場合には、多型はヘテロであると判定することができる。

25 (d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

30 (e) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

5 (f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによっても目的とする配列の増幅が確認できる場合には、多型はヘテロであると判定する

10 ことができる。

## 7. 遺伝子多型検出用キット

本発明の方法を行うために使用するプライマー及び試薬類を遺伝子多型検出用キットとして提供することができる。そのようなキットは以下の物を含む。

15 キット1：(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

20 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液；

(13) 以下のものを含む、遺伝子多型検出用キット：

25 (a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

30 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマ

一；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

キット2：

5 (a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

10 (b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

15 (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液。

キット3：

20 (a) 以下の(i)乃至(v)の特徴を有するオリゴヌクレオチド：

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

25 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

30 (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにお

いて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

- 5 (c) DNAポリメラーゼ；  
 (d) PCR緩衝液。

キット4：

(a) 以下の特徴を有するオリゴヌクレオチド：

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

15 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

20 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

- (c) DNAポリメラーゼ；  
 (d) PCR緩衝液。

25 本発明のこれらのキット1乃至4には、場合によっては電気泳動用の各種試薬、dNTP、電気泳動用マーカー等を含ませることもできる。

図面の簡単な説明

図1は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がない場合を示す。

30 図2は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がある場合を示す。

図3は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がない場合を示す。

図4は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がある場合を示す。

図5はPremix Taq を用いて各種プライマーを用いたPCRの結果を示す図である。

図6はPremix EX Taq を用いて各種プライマーを用いたPCRの結果を示す図である。

5 図7はPCRによって検出されたバンドの蛍光強度を数値化した図である。

図8はアンジオポエチン関連3遺伝子プロモーター内の多型を示す図である。

図9-Aはマウス AKR strain 由来のゲノムDNA (AKR) を鋳型としたPCRの結果を示す図である。

10 図9-BはKK マウス Nga strain 由来のゲノムDNA (KK/Nga) を鋳型としたPCRの結果を示す図である。

図10はAKRのゲノムDNA、KK/NgaのゲノムDNA、KK マウス Snk strain (KK/Snk) のゲノムDNA、並びに、AKRとKK/NgaのゲノムDNAを等量づつ混ぜたDNAを鋳型としたPCRの結果を示す図である。

図11はアンジオポエチン関連3遺伝子プロモーター内の多型を示す図である。

15 図12はPremix Taq を用いて各種プライマーを用いたPCRの結果を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例、参考例及び試験例にて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」 [Sambrook, J., Fritsch, E.F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989年に発刊] に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

#### (実施例1)

25 HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>l</sup>の合成

核酸自動合成機 (パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer) を用い、40 nmol のプログラムで行った。各合成サイクルにおける溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然オリゴヌクレオチド合成の場合と同じものを用いた。CPGは、約 0.1 μmol 用いた。非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第3420984号の実施例22 (5'-0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン

-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC (島津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液 : 5%アセトニトリル、0.1M 酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B 溶液 : アセトニトリル、B% : 10%→ 50% (10min, linear gradient) ; 60°C ; 2 ml/min ; 254 nm) にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAA を除いた。80%酢酸水溶液 (200 μl) を加え、20 分放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち逆相HPLC (島津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液 : 5%アセトニトリル、0.1M TEAA, pH 7.0、B 溶液 : 25%アセトニトリル、0.1M TEAA、B% : 0%→ 40% (10min, linear gradient) ; 60°C ; 2 ml/min ; 254 nm) にて精製し、目的物のピークを集めた。減圧下溶媒を留去後、水 1ml に溶かし、(9.4 A<sub>260</sub> units)。また、本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 6214.11、測定値 : 6214.62)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

#### (実施例 2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>t</sup> の合成

実施例 2 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (21 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 6229.12、測定値 : 6229.21)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

#### (実施例 3)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>t</sup> の合成の合成

実施例 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.9 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 8530.67、測定値 : 8530.75)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号

60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

(実施例 4)

HO-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-5C<sup>c2p</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>I</sup> の合成の合成

5 実施例 4 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (10.1 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8515.66、測定値 : 8515.56)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

(参考例 1)

10 HO-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>I</sup>

参考例 1 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列であり、配列表の配列番号 1 に示されている。

15 (参考例 2)

HO-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>I</sup>

参考例 2 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列であり、配列表の配列番号 2 に示されている。

(参考例 3)

HO-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>c2t</sup> の合成

参考例 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (0.3 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 5 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホアミダイト) の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6200.25)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例4)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>e2t</sup> の合成

参考例4の化合物は、実施例1と同様に合成した (0.94 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト)、の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.06)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## (参考例5)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>e2p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例5の化合物は、実施例1と同様に合成した (2.28 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6200.26)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例6)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>e2p</sup>-T<sup>t</sup> の合成

参考例6の化合物は、実施例1と同様に合成した (4.98 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオンESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.26)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## (参考例 7)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 7 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (4.32 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6199.95)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例 8)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 8 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.0 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.06)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## (参考例 9)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>e1p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 9 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (13.28 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、文献 Tetrahedron (1998) 54, 3607-3630. 記載の 5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-メチレン-4-N-ベンゾイルレシチン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト、の化合物 (C<sup>e1p</sup>) を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6186.05、測定値 : 6186.45)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例 10)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>e1p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 10 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.0 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、文献 Tetrahedron (1998) 54, 3607-3630. 記載の 5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-メチレン-4-N-ベンゾイルレシチジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト、の化合物 (C<sup>e1p</sup>) を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6201.07、測定値 : 6201.14)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

(参考例 1 1)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>t</sup> の合成

参考例 1 1 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列であり、配列表の配列番号 3 に示されている。

15 (参考例 1 2)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 1 2 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であり、配列表の配列番号 4 に示されている。

20 (参考例 1 3)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>e2t</sup> の合成

参考例 1 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (7.8 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト) の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8516.64、測定値 : 8515.88)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

## (参考例 1 4)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-5C<sup>e2l</sup> の合成

参考例 1 4 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (7.4 A<sub>260</sub> units)。但し、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8516.66、測定値 : 8516.00)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

## (参考例 1 5)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>e2p</sup>-T<sup>l</sup> の合成

参考例 1 5 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.4 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8516.64、測定値 : 8516.32)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

## (参考例 1 6)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>e2p</sup>-C<sup>l</sup> の合成

参考例 1 6 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (7.9 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8501.63、測定値 : 8500.70)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

## (参考例 1 7)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>l</sup> の合

成

参考例17の化合物は、実施例1と同様に合成した (9.7 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホアミダイトとしては、特許第3420984号の実施例14(5'-0-ジメトキシトリチル-2'-0,4'-C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3'-0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホアミダイト)の化合物を用いた。本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した (計算値: 8516.64、測定値: 8517.14)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

(参考例 18)

10 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例18の化合物は、実施例1と同様に合成した ( $7.2 \text{ A}_{260}$  units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第3420984号の実施例14(5'-0-ジメトキシトリチル-2'-0,4'-C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3'-0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)の化合物を用いた。本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値: 8501.63、測定値: 8501.65)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

(試験例1) Human prothrombin gene の SNP の検出

20 human prothrombin gene (coagulation factor II), GenBank accession No. M17262) の SNP (F2 20210G-A) の検出のために、Reverse primer, Human DNA は、Proligo 社の TrueSNP Demo Kit を同プロトコールに従って調製したものを使用した。Reverse primer のヌクレオチド配列は GenBank accession No. M17262 ) のヌクレオチド番号 26588-26605 に相当し、以下のとおりである。

25 5'—GGGTGAAGGCTGTGACCG—3' (配列表の配列番号5)

Forward primer として実施例1、実施例2、参考例1、参考例2、参考例3、参考例4、参考例5、参考例6、参考例7及び参考例8のいずれかに記載の化合物(1.25 μM) 5 μL、Reverse primer 1.3 μL、Premix Taq(宝酒造製) 12.5 μL、Human DNA 溶液 1 μL、滅菌水 5.2 μL を含む溶液を Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使って、PCR 反応 (Hot Start 法)を行った。反応サイクルは、94°C 10 分間の処理の後、94°C 1 分、63°C 1

分、72°C 1 分、の反応を 31 サイクル繰り返した。反応後、反応液 5 μL に 1 μL の loading solution を加え、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V 定電圧、約 1 時間) を行い、SYBR Green I (Cambrex 社製) で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad) を用いバンドを可視化し、Quantity One software (Bio-Rad) を使って定量した。

その結果を図 5 に示す。ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した化合物を Forward primer に用いた場合では、実施例 1 に記載の化合物では目的の遺伝子 (216 bp) の増幅が確認できたのに対し、実施例 2 に記載の化合物では目的の遺伝子 (216 bp) の増幅が確認できなかった。一方、天然型のオリゴヌクレオチドである参考例 1 及び参考例 2 に記載の化合物を Forward primer に用いた場合では、参考例 1 に記載の化合物だけではなく、参考例 10 2 に記載の化合物でも遺伝子の増幅が確認され、ミスマッチによる遺伝子の増幅が起きていた。また、ENA ユニットを 3' 末端に導入した参考例 3 及び 4 の化合物、並びに、ENA ユニットを 3' 末端から 2 番目に導入した参考例 5 及び 6 の化合物では目的のバンドの増幅は確認できなかった。このことから ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した化合物をプライマーに用いるとミスマッチがほとんどなく選択的な遺伝子 (216 bp) の増幅ができることがわかった。

また、図 6 においては、Premix Taq (宝酒造製) のかわりに、Premix EX Taq (宝酒造製) を用いた例を示す。この場合においても、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入したプライマーにおいてミスマッチがほとんど起こらず、実施例 1 のプライマーを用いたものが、最も効率的に、かつ、選択的に遺伝子が増幅された。

検出されたバンドの蛍光強度を数値化し、図 7 のようにプロットした。参考例 9、10 に記載の化合物は、LNA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した場合であり、参考例 10 の化合物を Forward primer に用いた場合、ミスマッチによる遺伝子の増幅が 15% 見られたのに対し、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した、実施例 2 の化合物を Forward primer に用いた場合では、ミスマッチによる遺伝子の増幅が 6% に過ぎず、ENA 体がミスマッチが少なく選択性が高いことが明らかになった。

(試験例 2) アンジオポエチン関連 3 (Angiopoietin-like 3) 遺伝子プロモーター内の多型の検出

(1) マウスゲノム DNA の調製

マウス AKR strain、KK マウス Nga strain 及び KK マウス Snk strain のマウス (4 週齢)

より採取した尾 (1. 5 cm) を  $840 \mu\text{l}$  の溶解液 ( $720 \mu\text{l}$  の  $1\times\text{SSC}$ 、 $80 \mu\text{l}$  の 10% SDS、 $40 \mu\text{l}$  の  $10\text{mg}/\text{mL}$  プロテイナーゼKを含む) に浸漬し、  
5  $50^\circ\text{C}$ で保温しながら一晩振盪した。次いで、 $1\text{mg}/\text{mL}$  リボヌクレアーゼAを  $20 \mu\text{l}$  加えて、 $50^\circ\text{C}$ で1時間保温した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、  
エタノール沈殿操作を1回行い、沈殿を  $10\text{mM}$  トリス-塩酸 (pH 7.5)、 $1\text{mM}$  EDTAを含む緩衝液  $150 \mu\text{l}$  に溶解した。溶液を分光光度計 (U-3000、(株)日立  
製作所製) で  $260\text{ nm}$  波長における吸光度を測定し、滅菌水を加えて濃度を  $25\text{ ng}/\mu\text{l}$  に調整してゲノムDNA試料とした。

### (2) PCR

10 Angiopoietin-like protein 3 遺伝子プロモーター内の多型は、direct sequenceの結果から、図8のような多型を持つ。図8ではマウス KK/Nga strain、KK/Snk strainと比べてマウス AKR strainでは「:」で示す2塩基 (CA) が欠失している多型を有することを示している。

PCRにおけるReverse primerは以下の配列：

15 5' -GTCACTAGACTACTGCTTACTGTCC-3' (配列表の配列番号 6)

(本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のスクレオチド番号 60658-60682 に相補的な配列である) のものを用いた。Forward primerとして実施例3、  
実施例4、参考例11、参考例12、参考例13、参考例14、参考例15、参考例16、参考例17  
及び参考例18のいずれかに記載の化合物 ( $1.25 \mu\text{M}$ )  $5 \mu\text{L}$ 、Reverse primer ( $1.25 \mu\text{M}$ )  $5 \mu\text{L}$ 、Premix Taq (宝酒造製)  $12.5 \mu\text{L}$ 、ゲノムDNA溶液 ( $100\text{ ng}/1\mu\text{L}$ )  $0.125 \mu\text{L}$ 、滅菌水  
20  $2.38 \mu\text{L}$  の溶液を、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使って、PCR反応 (Hot Start法)を行った。反応サイクルは、 $94^\circ\text{C}$  10分間の熱処理後、 $94^\circ\text{C}$  分、 $63^\circ\text{C}$  1分、 $72^\circ\text{C}$   
1分のサイクルを30サイクル繰り返した。反応後、反応液  $5 \mu\text{L}$  に  $1 \mu\text{L}$  のloading solutionを加え、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V定電圧、約1時間)  
25 を行い、SYBR Green I (Cambrex社製)で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad)を用い可視化した。

### (3) 結果

マウス AKR strain由来のゲノムDNA (AKR)を鋳型として用いた結果を図9-Aに示す。  
ENAユニットを3'末端から3番目に導入した実施例3及び4に記載の化合物において、実  
30 施例3の化合物をforward primerに用いたものが、選択的に遺伝子 (152 bp)を增幅でき

ることがわかった。

KK マウス Nga strain 由来のゲノム DNA (KK/Nga) を鋳型に用いた場合を図 9-B に示す。 ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した実施例 3 及び 4 に記載の化合物において、実施例 4 に記載の化合物を Forward primer に用いたものが、最も効率的に、かつ、選択的に 5 遺伝子 (154bp) を增幅できることがわかった。

図 10 に、実施例 3 及び 4 に記載の化合物のいずれかを Forward primer として用い、AKR のゲノムDNA、KK/Nga のゲノムDNA、KK マウス Snk strain (KK/Snk) のゲノムDNA、並びに、AKR と KK/Nga のゲノムDNA を等量づつ混ぜたDNA (Mix) を鋳型としたPCR の結果を示した。図 10 A に示したように、AKR では実施例 3 に記載の化合物を Forward primer として用いたもので選択的な遺伝子の増幅が確認され、また KK/Nga、KK/Snk では 10 実施例 4 に記載の化合物を Forward primer として用いたもので選択的な遺伝子の増幅が確認された。Mix では、実施例 3 及び 4 に記載のいずれの化合物を Forward primer として用いた場合にも遺伝子の増幅が確認され、多型がヘテロである場合でも、見分けがつくことが示された。また、図 10 B に示したように、すべてが天然型DNA プライマーである参考 15 例 11 及び 12 に記載の化合物を Forward primer として用いた場合、目的のバンドの増幅以外に副生成物が見られ、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した実施例 3 及び 4 に記載の化合物の組み合わせの方が遺伝子多型検出に優れていることがわかった。

(実施例 5) HO-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>e2P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>I</sup>  
の合成

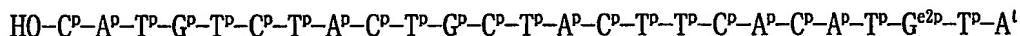
20 核酸自動合成機 (パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer) を用い、40 nmol のプログラムで

HO-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-C<sup>P</sup>-A<sup>P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>e2P</sup>-T<sup>P</sup>-G<sup>I</sup> を合成した(以下、「プライマー A」とする。各合成サイクルにおける溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然オリゴヌクレオチド合成の場合と同じものを用いた。CPG は、約 0.1 μmol 用いた。非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -0-ジメトキシトリチル-2' -0, 4' -0-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -0-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC (島津製作所製 LC-10VP、

カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液：5%アセトニトリル、0.1M 酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B 溶液：アセトニトリル、B% : 10%→ 50%(10min, linear gradient) ; 60°C ; 2 ml/min ; 254 nm) にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAA を除いた。80%酢酸水溶液 (200 μl) を加え、20 分放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち逆相HPLC (島津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液：5%アセトニトリル、0.1M TEAA, pH 7.0、B 溶液：25%アセトニトリル, 0.1M TEAA、B% : 0%→ 40%(10min, linear gradient) ; 60°C ; 2 ml/min ; 254 nm) にて精製し、目的物のピークを集めた。減圧下溶媒を留去後、水 1ml に溶かし、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値 : 7625.0、測定値 : 7624.1)。

本化合物 (プライマーA) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T であって、ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列である。

(実施例 6) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>  
の合成



(以下「プライマーB」とする。) を、実施例 5 と同様の方法で合成し、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値 : 7609.0、測定値 : 7609.2)。

本化合物 (プライマーB) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T になっている配列である。

(実施例 7) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>  
の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>  
(以下、「プライマーC」とする。) を、実施例 1 と同様の方法で合成し、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値 : 7650.0、測定値 : 7649.4)。

本化合物 (プライマーC) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G であって、ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列である。

(実施例 8) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>  
の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup> (以下、「プライマーD」とする。) を、実施例5と同様の方法により合成し、MALDI-TOF質量分析により同定した(計算値: 7634.1、測定値: 7634.2)。

本化合物(プライマーD)の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14記載のヌクレオチド番号60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号60522のCがGになっている配列である。

(参考例19) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

10 の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

(以下、「プライマーE」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物(プライマーE)の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14記載のヌクレオチド番号60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号60522のCがTであって、ヌクレオチド番号60523のAがGになっている配列であり、配列表の配列番号7に示されている。

(参考例20)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup> (以下、「プライマーF」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物(プライマーF)の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14記載のヌクレオチド番号60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号60522のCがTになっている配列であり、配列表の配列番号8に示されている。

(参考例21) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup>

25 の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup> 本 (以下、「プライマーG」とする。)は核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

プライマーGの塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14記載のヌクレオチド番号60499-60523の配列であって、ヌクレオチド番号60522のCがGであって、ヌクレオチド番号60523のAがGになっている配列であり、配列表の配列番号9に示されている。

## (参考例 2 2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

の合成

5 HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup> 本（以下、「プライマーH」とする。）を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

プライマーHの塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G になっている配列であり、配列表の配列番号 10 に示されている。

10 (試験例 3) アンジオポエチン関連 3 (Angiopoietin-like 3) 遺伝子プロモーター内の SNP の検出

マウス AKR 系統 (strain) 及び KK マウス Nga 系統 (strain) 由来マウス（4週齢）より採取した尾（1. 5 cm）を 840 μl の溶解液（720 μl の 1×SSC、80 μl の 10% SDS、40 μl の 10 mg/ml プロテイナーゼ K を含む）に浸漬し、50 °C で保温しながら一晩振盪した。次いで、1 mg/ml リボヌクレアーゼ A を 20 μl 加えて、50 °C で 1 時間保温した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回、エタノール沈殿操作を 1 回行い、沈殿を 10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1 mM EDTA を含む緩衝液 150 μl に溶解した。その後、分光光度計 (U-3000、(株) 日立製作所製) で 260 nm 波長における吸光度を測定し、滅菌水を加えて濃度を 25 ng/μl に調整してゲノム DNA 試料とした。

20 Angiopoietin-like 3 遺伝子プロモーター内の SNP は、direct sequence の結果から、図 11 のような SNP を持つ。

リバース・プライマー (Reverse primer) のヌクレオチド配列は：

5' -GTCACTAGACTACTGCTTACTGTCC-3' (配列表の配列番号 6)、

25 (本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60658-60682 に相補的な配列である。) である。

Premix Taq (宝酒造製) 12.5 μL、ゲノム DNA 溶液 (100 ng/1 μL) 0.125 μL、リバース・プライマー (1.25 μM) 5 μL、滅菌水 2.38 μL、フォワード・プライマー (forward primer) として実施例または、参考例に記載の化合物（プライマー A、プライマー B、プライマー C、プライマー D、プライマー E、プライマー F、プライマー G 及びプライマー H）(1.25 μM) を 5 μL になるように調製し、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使つ

て、PCR 反応 (Hot Start 法) を行った。反応サイクルは、94°C、10 分後、94°C 1 分、63°C 1 分、72°C 1 分、これを 30 サイクル繰り返した。

反応後、反応液 5 μL に 1 μL の添加液 (loading solution) を加え、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V 定電圧、約 1 時間) を行い、SYBR Green I (Cambrex 社製) で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad) を用い可視化した。

PCR 反応が正確に行われた場合、マウス AKR 系統 (strain) 由来のゲノム DNA (AKR) を用いた場合、選択的に遺伝子 (182 bp) が増幅され、KK マウス Nga 系統 (strain) 由来のゲノム DNA (KK/Nga) を用いた場合、選択的に遺伝子 (184 bp) が増幅されると予想された。

結果を図 12 に示す。プライマー E 又はプライマー F をフォワード・プライマーとして PCR を行ったところ、マウス AKR 系統由来のゲノムDNA では、プライマー E をプライマーとして用いた場合に遺伝子の増幅が確認された。一方、KK マウス Nga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマー F をプライマーとして用いた場合及びプライマー E をプライマーとして用いた場合の両方で遺伝子の増幅が観察された。

またプライマー A 又はプライマー B をプライマーとして PCR を行ったところ、マウス AKR 系統由来のゲノムDNA では、プライマー A をプライマーとして用いた場合に遺伝子が増幅され、KK マウス Nga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマー B をプライマーとして用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

プライマー G 又はプライマー H をプライマーとして用いた場合、マウス AKR 系統由来のゲノムDNA では、プライマー G をプライマーとして用いた場合に目的の遺伝子産物が増幅されたが、プライマー H をプライマーとした場合には、目的の大きさより小さい副生成物と考えられる増幅産物が得られた。また、KK マウス Nga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマー H をプライマーとした場合には、目的の遺伝子産物だけでなく、目的よりも小さい鎖長を持つ副生成物と考えられる増幅産物が得られた。

プライマー C 又はプライマー D をプライマーとして用いた場合、マウス AKR 系統由来のゲノムDNA では、プライマー C をプライマーとして用いた場合に遺伝子が増幅され、さらに、KK マウス Nga 系統由来のゲノムDNAにおいては、プライマー D をプライマーとして用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

以上のことから ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入したプライマーを用いること

により、ENAユニットを導入していない、従来のプライマーと比べて検出効率が向上することが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

5 本発明の方法により、遺伝子多型の検出が可能となる。また、本発明の遺伝子多型の検出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになる。

また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットによって、種々の遺伝子多型を検出  
10 できる。本発明は、医療、農業、食品、工業等の種々の産業に利用することができるが、遺伝子多型の検出を必要とする限りにおいて産業分野は制限されない。

## 請求の範囲

1. 以下の(a)及び(b)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a)オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b)3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する。

2. 以下の(a)及び(b)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

10 (a)オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b)3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する。

15 3. 以下の(a)乃至(d)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a)オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(b)オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(c)その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(d)オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

25 4. 以下の(a)乃至(d)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a)オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(b)オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；  
(d) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目（3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目）のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

- 5 5. 18乃至25塩基長からなることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩。
6. 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法。
7. 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法。
- 10 8. 以下の工程（a）及び（b）を含む、遺伝子多型の検出方法：  
(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を錆型として、請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程；
- 15 (b) 工程（a）によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程。
9. 以下の工程（a）及び（b）を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法：  
(a) 遺伝子多型部位を含む核酸を錆型として、請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程；
- 20 (b) 工程（a）によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程。
10. 反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、TaqMan PCR及びMALDI-TOF/MS法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする請求項8又は9に記載の方法。
- 25 11. 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項6乃至10のいずれか1項に記載の方法。
12. 以下の（a）乃至（d）を含む、遺伝子多型検出用キット：  
(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチド

からなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

5 (c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

13. 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

15 (c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

14. 以下の(a)乃至(e)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(c) (a)又は(b)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液。

15. 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) 以下の(i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

5 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

10 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

15 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

16. 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

20 (a) (i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

25 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

30

- (b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；
- (c) DNAポリメラーゼ；
- (d) PCR緩衝液。

5 17. 以下の (a) 乃至 (e) を含む、遺伝子多型検出用キット：

- (a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；
  - (i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；
  - (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；
  - (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；
  - (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；
- (b) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；
  - (i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；
  - (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；
  - (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；
  - (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。
- (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；
- (d) DNAポリメラーゼ；

## (e) PCR緩衝液。

18. オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が18乃至25塩基長であることを特徴とする、請求項12乃至17のいずれか1項に記載の遺伝子多型検出用キット。
- 5 19. 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項12乃至18のいずれか1項に記載のキット。

図1

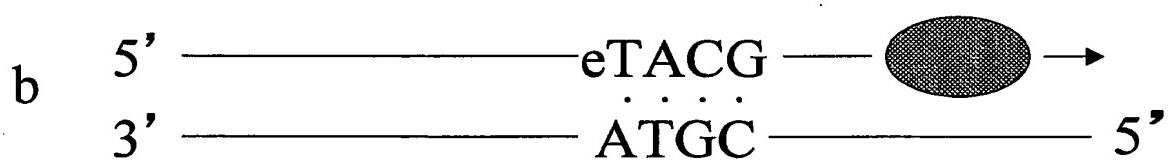
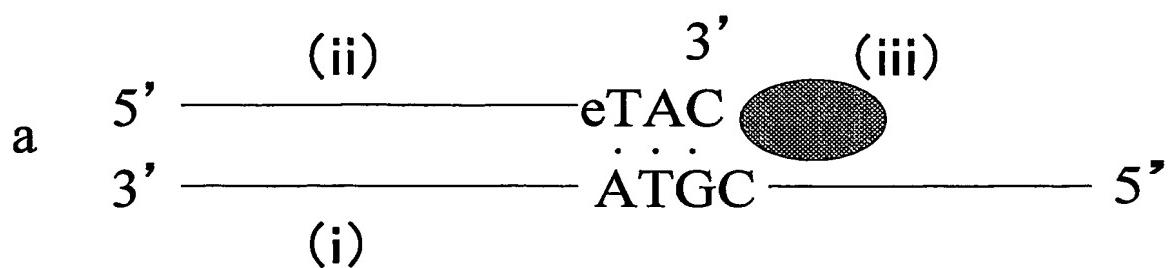


図2

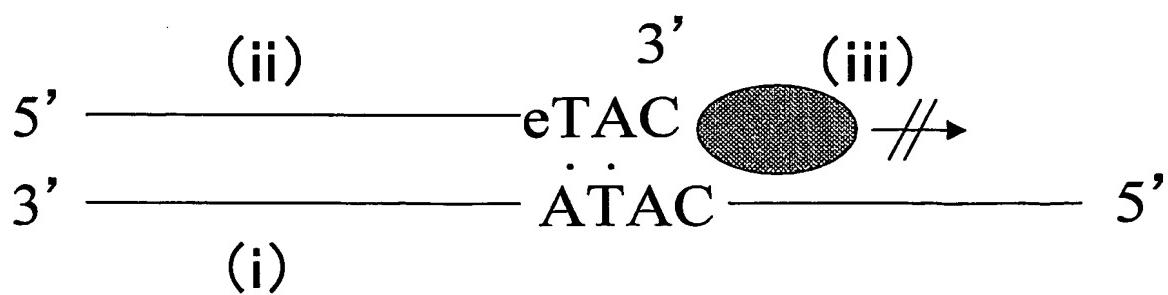


図3

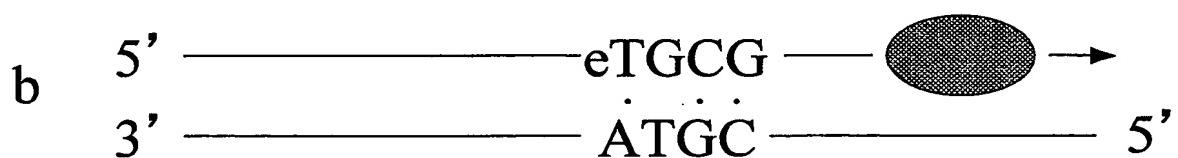
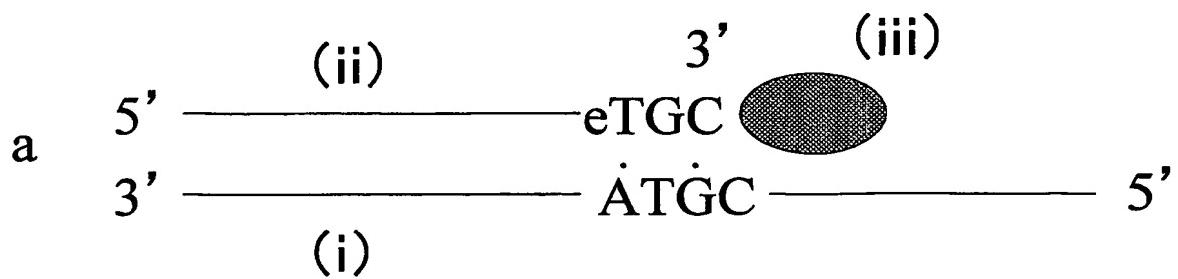
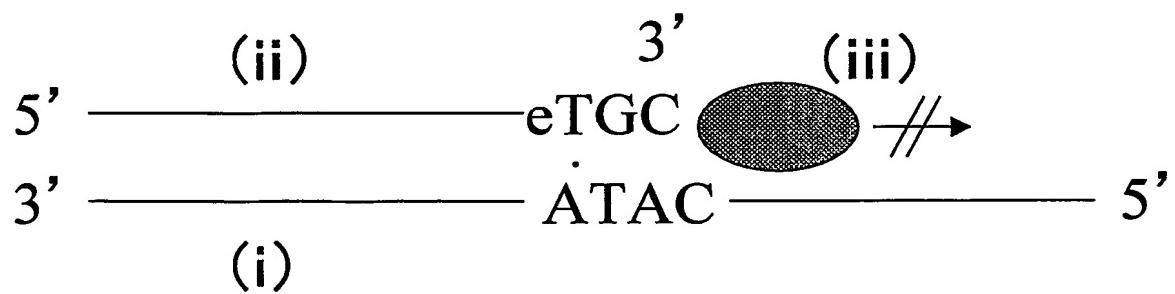


図4



**図5**

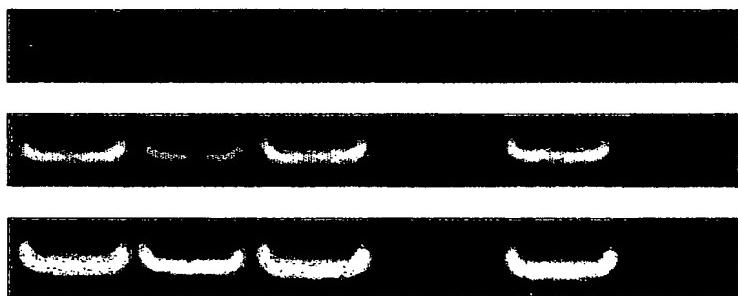
参考例1 参考例2 参考例3 参考例4 参考例5 参考例6 実施例1 実施例2 参考例7 参考例8



C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	3'末端の配列 ENAの修飾部位
なし	なし	1	1	2	2	3	3	4	4	

**図6**

参考例1 参考例2 参考例9 参考例10 実施例1 実施例2



25 サイクル	
27 サイクル	
29 サイクル	
C      T      C      T      C      T      3'末端の配列 なし    なし    LNA    LNA    ENA    ENA    3'末端から3番目修飾	

図7

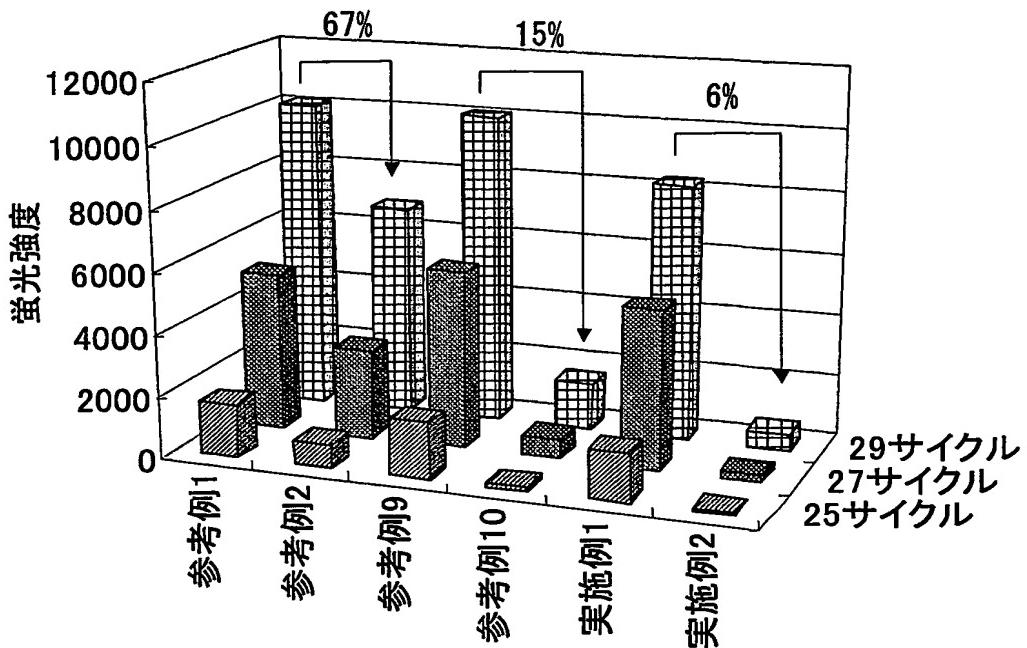


図8

(KK/Nga, KK/Snk)

(AKR)

ACAT  
---ATCTGTCTACATATATACACACACACA::T---

Primer

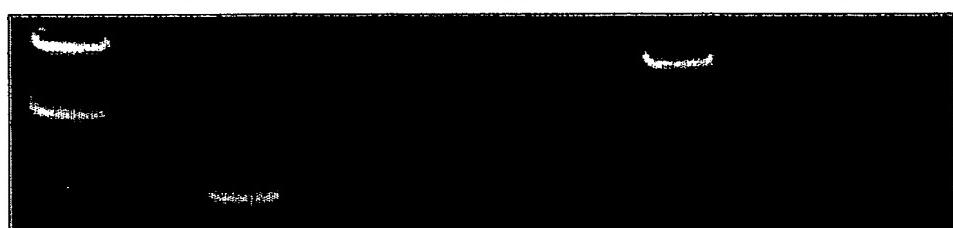
5' ATCTGTCTACATATATACACACACAT 3'  
 5' ATCTGTCTACATATATACACACACAC 3'

**図9****A**

マーカー 参考例12 参考例14 参考例16 実施例4 参考例18

参考例11 参考例13 参考例15 実施例3 参考例17

200 bp



100 bp

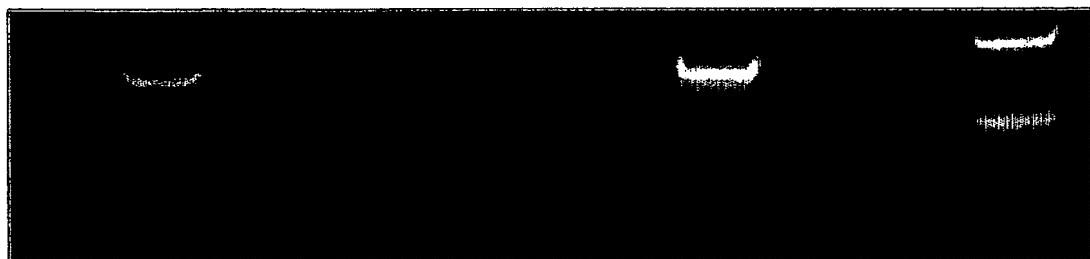
T C T C T C T C T C

3'末端の配列

**B**

参考例11 参考例13 参考例15 実施例3 参考例17 マーカー

参考例12 参考例14 参考例16 実施例4 参考例18

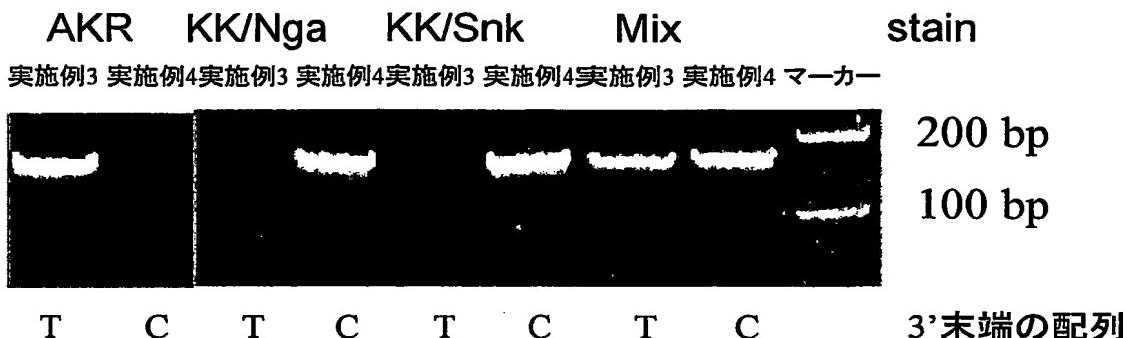


T C T C T C T C T C

3'末端の配列

図10

A



B



図11

(KK/Nga)  
(AKR)

A

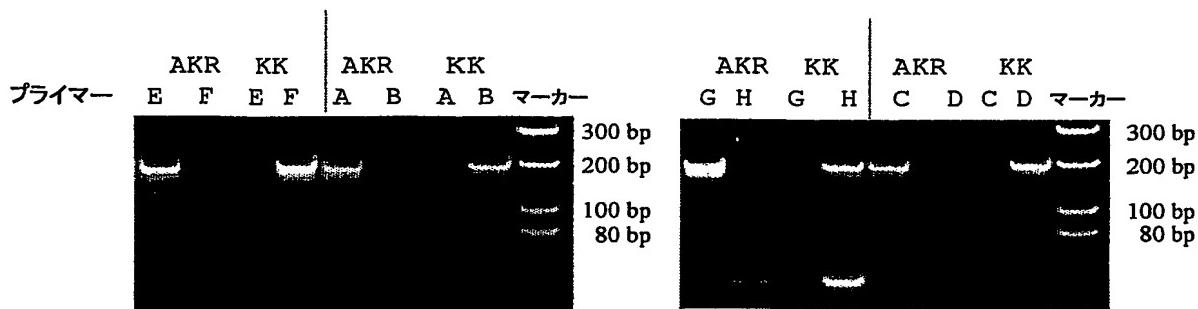
--CATGTCTACTGCTACTTCACATGCG---

Primer

5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKG3'5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKA3'

K=G/T, G=ENA

図12



## SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Method for identifying SNPs

<130> 2004073SU

<150> JP 2003-378039

<151> 2003-11-07

<150> JP 2004-121080

<151> 2004-04-16

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Koizumi, Makoto

<400> 1

cactgggagc attgaggctc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> (20)..(20)

<223>

<220>

<221> allele

<222> (20)..(20)

<223> C is transitioned to T

<400> 2

cactgggagc attgaggctt

20

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> allele

<222> (28)..(28)

<223> C is transitioned to T

<400> 3

atctgtctac atatatatac acacacat

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

atctgtctac atatatatac acacacac

28

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
gggtgaaggc tgtgacccg

18

<210> 6  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 6  
gtcactagac tactgcttac tgtcc

25

<210> 7  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primerE

<400> 7  
catgtctact gctacttcac atgtg

25

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> primer F

<400> 8

catgtctact gctacttcac atgta

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer G

<400> 9

catgtctact gctacttcac atggg

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer H

<400> 10

catgtctact gctacttcac atgga

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016715

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOIZUMI, M. et al., Triplex formation with 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH, Nucleic Acids Res. (2003 June), Vol.31, No.12, pages 3267 to 3273	1-19
A	MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA) : Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorg.Med.Chem.Lett. (2002), Vol.12, No.1, pages 73 to 76	1-19
A	Masafumi MATSUO et al., Kosei Rodosho Seishin Shinkei Shikkan Kenkyu Itakuhi ni yoru Kenkyu Hokokushu, Heisei 14 Nendo (2003 July), page 590	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2005 (17.01.05)Date of mailing of the international search report  
01 February, 2005 (01.02.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl' C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl' C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JST Plus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOIZUMI M. et al., Triplex formation with 2'-0, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH, Nucleic Acids Res. (2003-Jun), Vol. 31, No. 12, p. 3267-3273	1-19
A	MORITA K. et al. 2'-0, 4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2002), Vol. 12, No. 1, p. 73-76	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 02. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	松尾雅文 他, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集 平成14年度(2003-Jul), p.590	1-19